

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 663 639

(21) N° d'enregistrement national : 90 08013

(51) Int Cl⁵ : C 08 B 37/10; A 61 K 31/725

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 26.06.90.

(71) Demandeur(s) : RHONE-POULENC SANTE — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Debré Roger.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 27.12.91 Bulletin 91/52.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Rhône-Poulenc S.A. Rorer.

(54) Mélanges de polysaccharides de bas poids moléculaires procédé de préparation et utilisation.

(57) La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides sulfatés de poids moléculaire moyen inférieur à celui de l'héparine. L'invention concerne aussi un procédé de préparation de ces mélanges, et leur utilisation.

FR 2 663 639 - A1



La présente invention concerne le domaine des polysaccharides de bas poids moléculaires. Plus particulièrement, elle concerne le domaine des héparines de bas poids moléculaire.

Les héparines sont des substances biologiques d'extraction de la famille des glycosaminoglycanes, utilisées pour leurs propriétés anticoagulante et antithrombotique. Notamment, elles sont utilisées dans le traitement des thromboses veineuses post-opératoires. Cependant, dans leur forme native, les héparines présentent un certain nombre d'inconvénients qui limitent les conditions de leur utilisation. En particulier, l'activité anticoagulante peut occasionner des hémorragies, et la sensibilité à certains facteurs sériques, tel pf4, impose l'utilisation de doses relativement importantes. Il est donc nécessaire de privilégier l'activité antithrombotique, attribuée notamment à l'activité antiprothrombinase, au dépens de l'activité anticoagulante, attribuée à l'effet antithrombine.

Dans ce but, il a été proposé de fragmenter les héparines en molécules de poids moléculaires moyens plus faibles. En particulier, on connaît dans l'art antérieur le brevet européen EP 40144. Ce brevet décrit des mélanges de polysaccharides sulfatés ayant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine, possédant une double liaison éthylénique à l'une des extrémités de leur chaîne, et dont le poids moléculaire moyen en poids est compris entre 2000 et 10000 Daltons. Ces mélanges sont obtenus par dépolymérisation et saponification d'un ester d'héparine. Il est indiqué qu'ils présentent une activité antithrombotique élevée et une activité anticoagulante globale inférieure à celle de l'héparine.

Toutefois, l'un des problèmes majeurs rencontrés avec les héparines réside dans le fait qu'il s'agit de produits très hétérogènes. Il est donc difficile d'apprécier la contribution de chacune des espèces dans l'activité de

l'héparine, de connaître le comportement de ces espèces lors de la dépolymérisation, et enfin de contrôler la structure de ces espèces et leurs proportions respectives dans les produits finals. Pour ces raisons, les inconvénients mentionnés ci-avant n'ont pu être résolus de manière totalement satisfaisante. Notamment, les procédés décrits dans l'art antérieur, et en particulier dans le brevet EP 40144 ne permettent pas d'obtenir des mélanges possédant les propriétés pharmacologiques requises pour une meilleure application, à savoir une demi-vie plasmatique suffisamment élevée, une vitesse d'absorption assez grande, une forte biodisponibilité ou encore une faible "clearance".

D'autres procédés ont pourtant été décrits, permettant de fragmenter l'héparine, en vue de diminuer ses effets indésirables (Johnson et coll. Thrombos.Haemostas.Stuttg., 1976, 35, 586; Lane et coll. Thrombosis Research 16, 651, Lasker et coll. US 3,766,167). Chacun de ces procédés semble indiquer que l'activité recherchée est privilégiée lorsque le degré de fragmentation de l'héparine augmente (voir aussi la demande de brevet européenne EP 301618 relative à des pentasaccharides possédant une activité antithrombotique).

Dans le même sens, des études récentes sur le mécanisme d'action des héparines dans la formation de la thrombine ont mis en évidence une influence du poids moléculaire moyen des héparines sur leur activité in vitro (Béguin et coll., Thromb. Haemost., 61, 30, 1989). Les auteurs indiquent que les héparines de bas poids moléculaire possèdent plutôt une activité antiprothrombinase et les héparines de poids moléculaire plus élevé, une activité antithrombine.

Parallèlement, il a également été proposé de fractionner les héparines, afin d'extraire des mélanges de poids moléculaire moyen plus homogène. On connaît en particulier la demande de brevet européenne EP 337327, qui décrit un procédé de préparation de fragments d'oligosaccharides dérivés de l'héparine, permettant d'obtenir des mélanges ayant une dispersion moléculaire

réduite. Selon ce procédé, on élimine préalablement les fractions de poids moléculaire inférieur à 3000 daltons, ce qui conduit à enlever du produit final les fragments contenant moins de 10 à 16 saccharides, et les espèces de poids moléculaire supérieur à 7000 5 daltons. Selon les inventeurs, ce traitement, qui a pour objectif d'homogénéiser le mélange final, permettrait de diminuer l'activité anticoagulante, tout en conservant l'activité antithrombotique recherchée.

Cependant, en dépit de ces travaux, les mélanges obtenus 10 présentent toujours un effet hémorragique résiduel, ou une activité antithrombotique trop faible. De plus, rien dans l'art antérieur ne permet de déterminer quelles sont les propriétés qui doivent être réunies pour obtenir une activité biologique optimale. D'ailleurs, la conclusion des auteurs de l'article précité est éloquente : 15 "Nous ne savons pas quelle est la combinaison optimale des propriétés de l'héparine. La caractérisation précise de différentes préparations, et la corrélation de ces propriétés avec des observations cliniques pourrait éventuellement apporter une réponse".

Il a maintenant été trouvé qu'il est possible d'obtenir 20 des héparines présentant des propriétés avantageuses, notamment pour leur utilisation dans la prophylaxie et le traitement des accidents thrombotiques. De manière inattendue, la demanderesse a en effet trouvé que la présence dans le produit final, à la fois d'espèces de haut et de bas poids moléculaire, conférait une 25 meilleure activité au produit. Contrairement aux indications de l'art antérieur, il semble donc préférable de conserver dans le mélange final des espèces de poids moléculaire élevé, ainsi qu'une certaine hétérogénéité.

L'étude pharmacocinétique des mélanges de l'invention 30 montre qu'ils rassemblent des propriétés particulièrement avantageuses.

En particulier, les mélanges de l'invention présentent un temps de demi-vie supérieur aux autres produits connus, et également à l'héparine mature. Par ailleurs, par rapport à cette dernière, il est important de souligner que la demi-vie des 5 mélanges de l'invention est indépendante de la dose injectée. Ceci est intéressant puisque l'effet produit est beaucoup plus prédictif que dans le cas de l'héparine.

De plus, chez l'homme, les mélanges de l'invention présentent une excellente biodisponibilité, mesurée par l'activité 10 anti Xa. Ainsi, de 30% environ pour l'héparine, elle est de 90% environ pour les mélanges de l'invention. Ceci est très avantageux car permet de réduire les doses injectées et d'améliorer la potentialité thérapeutique.

Par ailleurs, une autre propriété importante des mélanges 15 de l'invention réside dans leur grande vitesse d'absorption. Cette caractéristique permet d'obtenir une activité biologique quasi instantanée, et offre donc une plus grande sécurité dans le traitement, en couvrant rapidement le patient.

Une autre caractéristique des mélanges selon l'invention 20 est leur faible "clearance" comparativement aux autres produits et à l'héparine mature. Grâce à leur structure chimique, à leur poids moléculaire ou à leur taux de sulfate, ces mélanges présentent en effet une résistance particulière à la dégradation (désulfatation, hydrolyse) et à l'élimination, qui augmente encore leurs capacités 25 thérapeutiques.

Egalement, les préparations de l'invention possèdent un temps de résidence accru par rapport à l'héparine de départ. Cette propriété se traduit par un prolongement du temps pendant lequel le produit reste actif *in vivo*, et donc par une meilleure efficacité 30 thérapeutique.

De plus, ces préparations présentent également une sensibilité réduite aux facteurs sériques, qui augmente leur durée d'action *in vivo* et permet de les utiliser à des doses faibles.

Ces propriétés particulièrement avantageuses sont obtenues en contrôlant, au cours du procédé de préparation, certaines caractéristiques structurales des espèces en présence, ainsi que leur répartition moléculaire. Les mélanges ainsi obtenus sont dans 5 un rapport favorable entre les fractions de hauts et de bas poids moléculaires, qui leur confère les propriétés antithrombotiques requises, avec un effet hémorragique faible.

Cette caractéristique de l'invention est exprimée à la fois par le pourcentage de chaînes lourdes et de chaînes légères et 10 par le rapport entre le poids moléculaire moyen en poids des mélanges et leur poids moléculaire moyen en nombre, qui reflète la dispersion moléculaire.

Un objet de la présente invention réside donc dans des mélanges de polysaccharides sulfatés présentant la structure 15 générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine, caractérisés en ce qu'ils ont un poids moléculaire moyen en poids inférieur à celui de l'héparine, contenant entre 9 et 20% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons et entre 5 et 20 % de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons, et 20 dans lesquels le rapport poids moléculaire moyen en poids / poids moléculaire moyen en nombre est compris entre 1,3 et 1,6.

Par ailleurs, la demanderesse a constaté qu'il est possible d'améliorer encore les propriétés des mélanges en diminuant leur taux d'impuretés. Notamment, la plupart des héparines 25 contiennent des contaminants tels que les acides nucléiques, les polypeptides, ou divers polysaccharides. Parmi ceux-ci, on peut citer en particulier les chondroïtines sulfates, et l'héparane ou le dermatane sulfate. Chacun de ces contaminants, de part son poids moléculaire très élevé, de part les substituants qu'il porte ou son degré de sulfatation, est capable d'interférer lors de la préparation 30 du produit (dans la dépolymérisation par exemple) pour modifier la répartition moléculaire finale, ou directement dans l'activité, en modifiant les proportions de

chaines actives notamment. La demanderesse a maintenant mis au point un procédé permettant d'éliminer ces impuretés, et a constaté une amélioration des qualités des mélanges ayant subi ce pré-traitement. L'effet de ce prétraitement peut être mesuré en 5 utilisant comme impureté témoin le dermatane sulfate.

Un objet plus particulier de la présente invention réside dans des mélanges de polysaccharides sulfatés présentant les caractéristiques énoncées ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils contiennent moins de 2% de dermatane sulfate.

10 Dans un mode préféré, les mélanges de polysaccharides sulfatés selon l'invention possèdent un poids moléculaire moyen en poids compris entre environ 3500 Daltons et environ 5500 Daltons.

Toujours préférentiellement, les chaines de polysaccharides sulfatés constituant les mélanges selon l'invention ont un 15 acide glucuronique-4,5 insaturé 3-O-sulfate à l'une de leurs extrémités.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de préparation de mélanges de polysaccharides sulfatés ayant un poids moléculaire moyen en poids inférieur à celui de l'héparine, contenant entre 9 et 20 % de chaines de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons et entre 5 et 20 % de chaines de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons, et dans lesquels le rapport poids moléculaire moyen en poids / poids moléculaire moyen en nombre est compris entre 1,3 et 1,6. Le procédé de l'invention est caractérisé 25 en ce que l'on effectue les étapes suivantes :

- dans une première étape, on salifie en milieu aqueux une héparine au moyen d'un sel d'ammonium quaternaire à longue chaîne,

30 - dans une deuxième étape, on estérifie le sel ainsi obtenu pour former un ester ayant un degré d'estérification compris entre 9,5% et 14,5%, et

- dans une troisième étape, on dépolymérise l'ester obtenu ayant un degré d'estérification compris entre 9,5 et 14,5%.

La demanderesse a en effet constaté que l'on peut contrôler le niveau de dépolymérisation, et donc les caractéristiques moléculaires du produit final, en jouant sur le degré d'estérification du sel d'héparine de départ.

Selon l'invention, il est donc possible d'obtenir directement et de manière reproductible des mélanges de polysaccharides sulfatés ayant les caractéristiques indiquées ci-dessus.

10 L'héparine de départ utilisée dans le procédé de l'invention est de préférence une héparine de porc, et notamment de muqueuse de porc. Il a en effet été trouvé que selon l'origine de l'héparine de départ, l'activité des mélanges obtenus pouvait varier de manière substantielle. Notamment, lorsque l'héparine de 15 départ est d'origine bovine, on obtient des mélanges ayant une activité anticoagulante supérieure à celle obtenue à partir d'héparine de muqueuse intestinale de porc.

De plus, dans une variante particulièrement avantageuse, le procédé de l'invention comprend en outre une étape préalable de 20 précipitation de l'héparine de départ au moyen d'un alcool. Ce prétraitement permet de diminuer le taux en impuretés de type chondroïtine sulfate ou héparane sulfate.

Un alcool donnant de bons résultats est par exemple le méthanol.

25 Le taux de pureté de l'héparine sodique peut ensuite être déterminé par chromatographie liquide d'exclusion stérique.

Cette étape préliminaire permet notamment de préparer une héparine ayant un taux de dermatane sulfate inférieur à 2%.

Plus précisément, la salification de l'héparine est réalisée de la manière suivante.

Le sel de l'héparine peut être obtenu par action d'un excès du sel correspondant sur une héparine sodique, en milieu aqueux, à une température voisine de 20°C. D'une manière avantageuse, le rapport en poids sel / héparine sodique est compris entre 2 et 3.

Par ailleurs, le sel d'ammonium quaternaire utilisé est de préférence un sel de benzéthonium, tel que notamment le chlorure de benzéthonium, que l'on peut faire réagir sur l'héparine sodique.

En ce qui concerne la deuxième étape, on préfère réaliser l'estérification dans les conditions suivantes.

L'ester partiel de l'héparine sous forme de sel, dont le taux d'estérification est compris entre 9,5 et 14,5% peut être obtenu par esterification du sel d'ammonium quaternaire à longue chaîne de l'héparine dans un solvant organique chloré, en présence d'un dérivé du chlore. De plus, l'efficacité de la réaction est augmentée en contrôlant les proportions des différents réactifs et la température et le temps de réaction.

D'une manière avantageuse, l'ester partiel de l'héparine est un ester aromatique.

Encore préférentiellement, le dérivé du chlore est le chlorure de benzyle, et le solvant chloré est choisi parmi le chloroforme ou le chlorure de méthylène.

Pour obtenir un taux d'estérification compris entre 9,5 et 14,5%, il peut être particulièrement avantageux d'utiliser, pour 1 partie en poids du sel de l'héparine, environ 1 partie en volume de dérivé du chlore, au sein de 3 à 5 parties en volume de solvant organique chloré, et d'effectuer la réaction pendant une période de 15 à 48 heures, à une température comprise entre 25 et 45°C, et de préférence, entre 30 et 40°C.

Dans un mode préféré de réalisation, l'ester partiel de l'héparine est sous forme d'un sel de sodium.

Les esters ainsi formés peuvent être récupérés par précipitation au moyen d'un alcool, tel que notamment le méthanol. De préférence, on utilise entre 1 et 1,2 volumes d'alcool par volume de milieu réactionnel. Le taux d'esterification de l'ester 5 peut ensuite être contrôlé par chromatographie en phase liquide haute performance. En particulier, dans le cas de l'ester benzylique, on peut mesurer la quantité d'alcool benzylique obtenue par saponification de l'ester à 0°C.

La dernière étape du procédé de l'invention est conduite 10 avantageusement de la manière suivante.

Préférentiellement, la dépolymérisation est réalisée en traitant l'ester avec une base organique forte en solution aqueuse. Plus précisément, on peut utiliser la soude.

Avantageusement, le rapport en poids base / ester est 15 compris entre 0,05 et 0,2, et de préférence, entre 0,08 et 0,15.

La température du milieu est ajustée à une valeur comprise entre 50 et 70°C, et de préférence, entre 55 et 65°C, et la réaction est effectuée durant une période allant de 30 minutes à 5 heures, et de préférence, de 1 à 2 heures.

De plus, il est préférable d'opérer dans un milieu dans 20 lequel le rapport en poids eau / ester est compris entre 15 et 30.

Une manière particulièrement avantageuse de réaliser la dépolymérisation consiste à mélanger :

- une partie en poids d'un ester aromatique de l'héparine 25 tel qu'obtenu à la deuxième étape, sous forme de sel, dont le taux d'esterification est compris entre 9,5 et 14,5%,

- entre 0,08 et 0,15 partie en poids de soude, et

- entre 20 et 30 parties en poids d'eau,

puis à maintenir pendant 1 à 2 heures la température entre 55 et 30 65°C.

Le produit peut ensuite être récupéré par neutralisation du milieu réactionnel au moyen d'un acide minéral dilué, et de préférence d'acide chlorhydrique, et précipitation en présence d'un alcool, tel que le méthanol.

5 De cette manière, il est possible d'obtenir directement, et de façon reproductible un mélange de polysaccharides sulfatés contenant

- entre 9 et 20% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons,

10 - entre 5 et 20% de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons,

et ayant un poids moléculaire moyen compris entre 3500 et 5500 Daltons et un rapport poids moléculaire moyen en poids / poids moléculaire moyen en nombre compris entre 1,3 et 1,6.

15 Les mélanges de la présente invention peuvent être utilisés de manière avantageuse comme agents antithrombotiques.

En particulier, ils sont applicables pour la prévention des thromboses veineuses dans les situations à risques. Ceci est également valable dans les situations à risque prolongé. En particulier, ces mélanges permettent pour la première fois de diminuer, à doses fixes, les risques d'accidents thrombotiques dans la chirurgie orthopédique. Ce risque, qui est de 70% en l'absence de tout traitement et d'environ 25% en présence d'héparine, se situe aux alentours de 10% avec les mélanges de l'invention, voire moins.

25 De même, injectés dans les tubulures d'un rein artificiel, ces mélanges peuvent réduire les thromboses susceptibles de s'y développer. Cette dernière application pouvant être étendue à la prévention des thromboses dans le matériel chirurgical.

Une autre utilisation thérapeutique avantageuse des mélanges de l'invention réside dans la prévention des accidents thrombotiques artériels, et notamment dans le cas d'infarctus du myocarde.

5 Par ailleurs, une application particulièrement intéressante des mélanges selon la présente invention réside dans la possibilité d'utiliser, pour la prévention des thromboses veineuses chez les malades chirurgicaux, un régime post-opératoire. Cette application est tout à fait avantageuse puisqu'elle permet d'éviter
10 10 les risques d'hémorragie pendant l'opération, et les problèmes de type et de doses d'anesthésiant, qui sont occasionnés par une prévention en régime pré-opératoire.

L'ensemble de ces propriétés démontre les potentialités thérapeutiques des préparations de l'invention.

15 Les exemples qui suivent, qui n'ont pas un caractère limitatif, illustrent la présente invention.

TECHNIQUES DE DOSAGE

Les poids moléculaires et les répartitions de poids moléculaire des produits sont déterminés par chromatographie
20 liquide haute pression avec deux colonnes en série, par exemple celles commercialisées sous la désignation TSK G 3000SW (30x0,75 cm) et Lichrosorb 100 Diol 10u (25x0,75 cm), ou TSK G 2000SW, couplées avec un détecteur réfractométrique. Le solvant utilisé est un tampon phosphate 0,3M pH 7, et le débit est de 0,7 ml/mn. Le système est calibré avec des étalons préparés par fractionnement de l'énoxaparine (PHARLUKA) par chromatographie d'exclusion sur agarose-polyacrylamide (IBF) selon la technique décrite par Barrow-Cliffe et Coll., Thromb. res., 12, 27-36 (1977-78) ou D.A. Lane et Coll., Thromb.res., 12, 257-271 (1977-78). Les

résultats sont calculés à l'aide du logiciel GPC6 (Perkin Elmer).

Dans les exemples qui suivent, l'activité anticoagulante globale des mélanges est mesurée par turbidimétrie en utilisant le premier étalon international d'héparine de bas poids moléculaire.

- 5 L'activité anti facteur Xa (antithrombotique) est mesurée par la méthode amidolytique sur un substrat chromogène décrite par Teien et Coll., Thromb.res., 10, 399-410 (1977), en utilisant le premier étalon international d'héparine de bas poids moléculaire.

EXEMPLE 1

- 10 Cet exemple illustre l'étape préalable de traitement de l'héparine sodique, permettant de réduire le taux d'impuretés de type chondroïtine sulfate et héparane sulfate.

A 10 g d'héparine commerciale (sel de sodium) en solution dans 100 ml d'eau contenant 3 g de chlorure de sodium, on ajoute 80 ml de méthanol. Après précipitation, le produit obtenu est filtré, rincé puis séché. Le taux de pureté de l'héparine sodique ainsi obtenue est mesuré par chromatographie liquide d'exclusion stérique, avec deux colonnes en série, celles commercialisées sous la désignation TSK 2000SW (60x0,75 cm) et TSK 3000SW (60x0,75 cm), couplées avec un détecteur UV réglé à 206 nm. La phase mobile utilisée est une solution aqueuse de sulfate de sodium 0,5M circulant à un débit de 1ml.mn⁻¹. L'essai est comparé à une héparine témoin contenant 2% de dermatane sulfate.

Dans les conditions indiquées ci-dessus, l'héparine obtenue contient moins de 2% de dermatane sulfate.

La même expérience est répétée en réalisant cette fois la précipitation en présence de 100 ml de méthanol. Après filtration, rinçage et séchage, le taux en dermatane sulfate de l'héparine sodique ainsi obtenue, déterminé comme indiqué ci-dessus, est
5 inférieur à 2%.

EXEMPLE 2

Cet exemple illustre la préparation du sel d'ammonium quaternaire de l'héparine.

A une solution de 10 g d'héparinate de sodium selon
10 l'exemple 1 contenant moins de 2% de dermatane sulfate, dans 100 ml d'eau, on ajoute une solution de 25 g de chlorure de benzéthonium dans 125 ml d'eau. Le produit obtenu à température ambiante est ensuite filtré, lavé à l'eau puis séché.

De manière identique, on prépare le sel de benzéthonium
15 d'une héparine n'ayant pas été soumise au traitement de l'exemple 1.

EXEMPLE 3

Cet exemple illustre la préparation et les propriétés des mélanges selon l'invention.

20 1. Estérification

A une solution de 15 g d'héparinate de benzéthonium préalablement traitée selon le procédé de l'exemple 1 dans 75 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 15 ml de chlorure de benzyle. La solution est chauffée à une température de 35°C, qui est maintenue
25 pendant 25 heures. On ajoute alors 90 ml d'une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol, filtre, lave au méthanol et sèche. On obtient ainsi 6,5 g d'ester benzylique d'héparine sous

forme de sel de sodium, dont le taux d'esterification, déterminé comme indiqué ci-dessus, est de 13,3%.

2. Dépolymérisation

10 g de l'ester benzylique d'héparine obtenu ci-dessus sous forme de sel de sodium sont dissous dans 250 ml d'eau. A cette solution chauffée à 62°C, on ajoute 0,9 g de soude. La température est maintenue 1 heure et 30 minutes à 62°C. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi vers 20°C et neutralisé par addition d'acide chlorhydrique dilué. On ajuste alors la concentration du milieu réactionnel à 10% en chlorure de sodium. Le produit est enfin précipité dans 750 ml de méthanol, filtré et séché. On obtient ainsi une héparine présentant les caractéristiques structurales suivantes :

- poids moléculaire moyen en poids : 3900 daltons
- 15 - répartition moléculaire :
 - . 20% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons
 - . 5,5% de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons.
- 20 - dispersion : $d = 1,39$
- activité anti Xa : 106 UI
- activité anti coagulante : 22,6 UI

EXEMPLE 4

D'une manière similaire, partant d'esters ayant un taux d'esterification compris entre 9,5 et 14,5%, on prépare des solutions d'héparine dépolymérisée ayant les caractéristiques structurales suivantes :

- a)
- poids moléculaire moyen en poids : 4425 Daltons
 - répartition moléculaire :
 - . 12,4% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons

9,3% de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons.

- dispersion : $d = 1,37$

- activité anti Xa : 102 UI

5 - activité anti coagulante : 33 UI

b) - poids moléculaire moyen en poids : 4579 Daltons

- répartition moléculaire :

. 11,2% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons

10 . 10,4% de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons.

- dispersion : $d = 1,37$

- activité anti Xa : 104 UI

- activité anti coagulante : 37 UI

15 c) - poids moléculaire moyen en poids : 4446 Daltons

- répartition moléculaire :

. 12,6% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons

. 9,5% de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons.

20 - dispersion : $d = 1,38$

- activité anti Xa : 100 UI

- activité anti coagulante : 32 UI

EXEMPLE 5

25 Cet exemple illustre la préparation d'un mélange n'entrant pas dans les caractéristiques de l'invention.

1. Esterification

A une solution de 15 g d'héparinate de benzéthonium préalablement traitée selon le procédé de l'exemple 1 dans 60 ml de 30 chlorure de méthylène, on ajoute 12 ml de chlorure de benzyle. La

solution est chauffée à une température de 28°C, qui est maintenue pendant 30 heures. On ajoute alors 90 ml d'une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol, filtre, lave au méthanol et sèche. On obtient ainsi 6,3 g d'ester benzylique d'héparine sous forme de sel de sodium. Le taux d'esterification de ce produit, déterminé par mesure, en chromatographie liquide à haute performance, de la quantité d'alcool benzylique libérée par saponification de l'ester à 0°C, est de 9,2%.

2. Dépolymérisation

10 10 g de l'ester benzylique d'héparine obtenu ci-dessus sous forme de sel de sodium sont dissous dans 200 ml d'eau. A cette solution chauffée à 58°C, on ajoute 1,1 g de soude. La température est maintenue 1 heure à 58°C. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi vers 20°C et neutralisé par addition d'acide chlorhydrique 15 dilué. On ajuste alors la concentration du milieu réactionnel à 10% en chlorure de sodium. Le produit est enfin précipité dans 600 ml de méthanol, filtré et séché. On obtient ainsi une héparine présentant les caractéristiques structurales suivantes :

- poids moléculaire moyen : 5425 daltons
- 20 - répartition moléculaire :
 - . 9,6% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons
 - . 19,5% de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons.
- 25 - dispersion : $d = 1,44$
- activité anti Xa : 122 UI
- activité anti coagulante : 68,6 UI

Ces résultats, qui font apparaître une activité anti-coagulante élevée, démontrent la supériorité des mélanges préparés 30 selon l'invention, et possédant les caractéristiques énoncées.

EXEMPLE 6

Cet exemple illustre le gain de stabilité *in vivo* des mélanges de l'invention, exprimé par leur demi-vie plasmatique.

Une première étude pharmacocinétique a été réalisée sur 5 des volontaires ayant entre 21 et 30 ans. Des injections sous-cutannées sont pratiquées de doses variant entre 20 et 80 mg/ml. Au cours du temps, des échantillons sont prélevés (4,5 ml), et stockés à 4°C environ. Les échantillons sont alors centrifugés 15 minutes à 2300 g et le plasma pauvre en plaquettes est séparé, et congelé 10 avant analyse. La demi-vie des mélanges est ensuite déterminée par mesure de l'activité anti Xa. Les résultats obtenus sont les suivants:

- Avec les mélange obtenus dans les exemples 3 et 4 :

. dose 40 mg : dans 75% des cas la demi-vie est supérieure à 4 heures, et elle est même supérieure à 4 heures et demie dans environ 45% des cas.

. dose 60 mg : dans 75% des cas, la demi-vie est supérieure à 3,7 heures.

- dans des conditions de dosage identiques, l'héparine intacte, injectée par voie intra-veineuse possède une demi-vie de 0,6 heures environ.

- Lorsque le produit est préparé selon le procédé décrit dans le brevet européen EP 40144, la demi-vie est supérieure à 4 heures et demie dans 17% des cas.

25 Une seconde étude réalisée dans des conditions similaires sur 20 patients a donné les résultats suivants pour les mélanges conformes à la présente invention :

. dose 40 mg : dans 80% des cas, la demi-vie est supérieure à 4 heure, et elle est supérieure à 4 heures et demie dans 30 40% environ des cas.

. dose 20 mg : dans 60% des cas, la demi-vie est supérieure à 3,9 heures.

REVENDICATIONS

- 1 - Mélanges de polysaccharides sulfatés présentant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine, caractérisés en ce qu'ils ont un poids moléculaire moyen en poids inférieur à celui de l'héparine, contiennent entre 9 et 20% de chaînes de poids moléculaire inférieur à 2000 Daltons et entre 5 et 5 20 % de chaînes de poids moléculaire supérieur à 8000 Daltons, et dans lesquels le rapport poids moléculaire moyen en poids / poids moléculaire moyen en nombre est compris entre 1,3 et 1,6.
- 10 2 - Mélanges selon la revendication 1 caractérisés en ce qu'ils contiennent moins de 2% de dermatane sulfate.
- 3 - Mélanges selon les revendications 1 et 2 caractérisés en ce qu'ils possèdent un poids moléculaire moyen compris entre environ 3500 Daltons et environ 5500 Daltons.
- 15 4 - Mélanges selon les revendications 1 à 3 caractérisés en ce que les chaînes de polysaccharides sulfatés ont un acide glucuronique-4,5 insaturé 3-O-sulfate à l'une de leurs extrémités.
- 5 - Procédé de préparation de mélanges de polysaccharides sulfatés selon l'une des revendications précédentes caractérisé en 20 ce que l'on effectue les étapes suivantes :
- dans une première étape, on salifie, en milieu aqueux, une héparine au moyen d'un sel d'ammonium quaternaire à longue chaîne,
- dans une deuxième étape, on estérifie le sel ainsi obtenu pour former un ester ayant un degré d'estérification compris entre 9,5% et 14,5%, et
- dans une troisième étape, on dépolymérise l'ester obtenu ayant un degré d'estérification compris entre 9,5 et 14,5%.

6 - Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que, dans la première étape, le rapport en poids sel / héparine est compris entre 2 et 3.

7- Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce
5 que la deuxième étape est effectuée dans un solvant organique chloré, en présence d'un dérivé du chlore.

8 - Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le dérivé du chlore est le chlorure de benzyle, et le solvant est choisi parmi le chloroforme et le chlorure de méthylène.

10 9 - Procédé selon les revendications 5, 7 ou 8 caractérisé en ce que l'esterification est effectuée en mélangeant 1 partie en poids du sel de l'héparine avec environ 1 partie en volume d'un dérivé du chlore, au sein de 3 à 5 parties en volume d'un solvant organique chloré à une température comprise entre 25
15 et 45°C, et de préférence entre 30 et 40°C.

10 - Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la troisième étape est réalisée en traitant l'ester avec une base organique forte en solution aqueuse.

11 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce
20 que le rapport en poids base / ester est compris entre 0,05 et 0,2, et de préférence, entre 0,08 et 0,15.

12 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le rapport en poids eau / ester est compris entre 15 et 30.

13 - Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que la température du milieu est ajustée à une valeur comprise entre 50 et 70°C, et de préférence, entre 55 et 65°C, et la réaction est effectuée durant une période allant de 30 minutes à 5 heures, et de préférence, de 1 à 2 heures.

14 - Procédé selon l'une des revendications 5 à 13 caractérisé en ce que, dans une étape préalable, on précipite l'héparine de départ au moyen d'un alcool.

15 - Utilisation des mélanges de polysaccharides sulfatés selon les revendications 1 à 4 pour la préparation de compositions thérapeutiques.

16 - Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation de compositions thérapeutiques destinées à la prévention des thromboses veineuses en régime post-opératoire.

REpublique française

2663639

N° d'enregistrement
national

**INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FR 9008013
FA 444198

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	FR-M- 2 739 (ROUSSEL-UCLAF) ---		
D,A	EP-A-0 040 144 (PHARMINDUSTRIE) ---		
A	EP-A-0 066 908 (AKZO) ---		
X	FR-A-2 548 672 (PHARMIKA LABORATORIES) * Pages 4-5 * ---		5-12
D,A	THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 61, no. 1, pages 30-34, Stuttgart, DE; S. BEGUIN et al.: "The mode of action of low molecular weight heparin preparation (PK10169) and two of its major components on thrombin generation in plasma" ---		
X	WO-A-8 103 276 (RIKEN LABORATORIES) * Page 5 * ---		1-4
X	EP-A-0 244 235 (NOVO INDUSTRI) * Page 18; tableau II * -----		1
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CLS)
			C 08 B
Date d'achèvement de la recherche			Examinateur
25-03-1991			LESEN H.W.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.		
A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général	D : cité dans la demande		
O : divulgarion non écrite	L : cité pour d'autres raisons		
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant		